

Aplicación de imagen hiperespectral para observar el efecto de la salinidad en hojas de lechuga

M.A. Lara¹, B. Diezma², L. Lleó¹, J.M. Roger³, Y. Garrido⁴, M.I. Gil⁴, M. Ruiz-Altisent²

¹LPF-TAGRALIA. Dpto. de Ciencia y Tecnología Aplicadas a la Ingeniería Técnica Agrícola, E.U.I.T. Agrícola, Univ. Politécnica de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain; miguelangel.larablas@gmail.com

²LPF-TAGRALIA. Departamento de Ingeniería Rural, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, CEI-Moncloa. Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid (Spain).

³IRSTEA, 361 rue Jean-François Breton BP 5095, 34196 Montpellier Cedex 5, France

⁴Grupo de Investigación en Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales, CEBAS-CSIC, Apdo. 164, 30100 Espinardo, Murcia

Resumen

La salinización en suelos de cultivos es un fenómeno muy relevante en el Sureste español que se produce por el empleo de aguas de riego salinas o de mala calidad. La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es uno de los cultivos hortícolas de mayor implantación en esta área, destinándose principalmente para consumo en fresco y en productos cuarta gama. La salinidad puede afectar a la productividad y calidad del cultivo, sin embargo, en determinadas concentraciones investigaciones previas muestran que la salinidad puede favorecer la conservación de las hojas tras el corte, disminuyendo los procesos de degradación enzimática y el desarrollo de microorganismos. El objetivo del presente trabajo es evaluar la viabilidad de la imagen hiperespectral (400 a 1000 nm) para identificar la influencia del estrés salino en lechuga 'baby' recién recolectada. Para ello, se han adquirido imágenes de 40 hojas de diferentes lechugas sometidas a tres soluciones salinas diferentes y a una solución control. Dichas imágenes fueron sometidas a preprocesado de espectros (suavizado con el algoritmo Savitsky-Golay + normalización SNV), combinado con Análisis de Componentes Principales. Las imágenes virtuales de scores generadas con el modelo muestran diferencias progresivas en los valores asignados a los píxeles de las imágenes a medida que aumenta la concentración salina de la solución aplicada al cultivo. Se observa cómo la solución salina afecta a la hoja cambiando la coloración de las zonas medias, posiblemente debido a la concentración de solutos. La interpretación de los loadings de estos modelos permite conocer cómo afecta la salinidad al comportamiento espectral de las hojas. La imagen hiperespectral puede tener un gran potencial para identificar los límites de salinidad tolerados y evitar concentraciones tóxicas que afecten negativamente la vida útil de las hortalizas de hoja. Este conocimiento permitirá desarrollar índices multispectrales capaces de identificar hojas afectadas por salinidad durante su cultivo y procesamiento postcosecha.

Palabras clave: análisis de imagen hiperespectral, espectroscopía, técnica no destructiva, hojas de lechuga, salinidad.

Hyperspectral images for the detection of salinity effect on lettuce leaves

Abstract

Saline soils cover a very important area in the southeast of Spain. Salinization processes of fruit crop and horticultural soils are being produced due to the use of saline irrigation or low quality water. Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most implanted horticultural crops in this area. Soil and water salinity causes productivity losses, because of the decrease in the growth of the plants, and quality losses. High levels of salinity generate necrosis in the leaves. Many studies also show that a great saline concentration in the leaves improves postharvest shelf life after harvest, decreasing enzymatic activities and microbial decay. Fast and non destructive techniques could contribute to the characterization of the effect of salinity and its distribution in lettuce leaves. The aim of this study is to evaluate the feasibility of hyperspectral imaging to identify the influence of salt stress in fresh harvested baby lettuce. Forty leaves of "Baby lettuce" were selected. Samples were submitted to hydroponic culture in Hoagland solution as control and 3 different saline solutions (+50 mM NaCl, +100 mM NaCl and +150 mM NaCl) (10 leaves for each level). Hyperspectral images (400 – 1000 nm) from the surface of each leaf have been acquired and a preprocessing procedure (smoothing with Savitsky-Golay algorithm and normalization SNV), combined with Principal Component Analysis has been applied in order to generate a model able to monitor the salinity effect in the leaves. Virtual images of scores generated with this model show clear and progressive differences as the saline concentration increases. It can be observed how the effect of salinity seems to be higher in the surface area of the leaves, maybe due to the concentration of solutes. The practical use of hyperspectral images could be of great interest to identify the tolerance limits to avoid the risk of toxic concentrations that negative affect the shelf life of leafy vegetables. The interpretation of the loading of this model will allow developing multispectral indexes capable to determine the effect of saline concentration on the lettuce leaves during cultivation and postharvest processes.

Keywords: hyperspectral image analysis, spectroscopy, non-destructive assessment, lettuce leaves, salinity.

Introducción y/o Justificación

La salinidad del suelo y/o del agua de riego es un factor determinante en el crecimiento de la mayoría de cultivos hortícolas, llegando a causar verdaderos problemas en la agricultura, principalmente en regiones áridas o semiáridas (Shannon et al., 1994). Los suelos salinos ocupan una gran superficie en el Sureste español, y la lechuga (*Lactuca sativa* L.) es uno de los cultivos hortícolas de mayor implantación en esta área; su producción se destina principalmente para consumo en fresco y en productos cuarta gama.

La tolerancia a la salinidad de la lechuga depende en gran medida de la variedad cultivada, aunque influyen otra serie de factores del cultivo, del suelo y ambientales (Maas y Hoffman, 1977). La lechuga es moderadamente sensible a la salinidad y a partir de cierto nivel ve afectado su desarrollo (Ayers et al., 1951).

Los cultivos herbáceos afectados por la salinidad (en umbrales moderados) no suelen presentar daños visibles en las hojas, aunque su desarrollo y productividad disminuyen (Maas y Hoffman, 1977). Sin embargo, cuando la salinidad provoca desequilibrios en la concentración de determinados elementos minerales pueden aparecer daños en el tejido foliar (Eraslan et al., 2007; Carassay et al., 2012).

Un estrés salino moderado en el cultivo de la lechuga puede tener efectos positivos que se traducen en un aumento de la vida útil del producto debido a una menor actividad de la polifeniloxidasas y de la peroxidasa (Chisari et al., 2010), y deterioro microbiológico (Scuderi et al., 2011).

La imagen hiperespectral se ha utilizado ampliamente para detectar niveles de salinidad en suelos y vegetación por teledetección, desarrollándose numerosos índices espectrales (Hamzeh et al., 2013). Sin embargo, no se ha empleado a nivel local para observar los efectos de la salinidad en los tejidos. En el presente trabajo se utilizan técnicas de imagen hiperespectral como procedimiento no destructivo para identificar la influencia del estrés salino en lechuga “baby” recién recolectada.

Materiales y Métodos

Se cultivaron 40 plantas de lechuga ‘baby’ en cultivo hidropónico, utilizando ocho cubetas provistas de una tapadera con orificios. En cada orificio se colocó una plántula hasta un total de cinco por cubeta. Las ocho cubetas se dividieron en cuatro grupos de dos, correspondientes al tratamiento de control (Ct) y a los tratamientos de salinidades S1, S2 y S3 (S1 50 mM NaCl, S2 100 mM NaCl y S3 150 mM NaCl, respectivamente). Se empleó solución ‘Hoagland’ como solución control, a la que se le añadieron las tres soluciones salinas. Tras el desarrollo de las lechugas, llegado el punto de recolección, se seleccionaron 10 hojas de dimensiones similares para cada uno de los cuatro tratamientos.

Las imágenes se adquirieron con un sistema de visión hiperespectral (VNIR 400 a 1000 nm, 189 longitudes de onda de Headwall Photonics Hyperspec™, con lámpara halógena). La resolución espacial fue de 0.26 mm/píxel. Las muestras fueron escaneadas mediante un sistema de barrido lineal. Durante la adquisición se computaron imágenes hiperespectrales de reflectancia relativa considerando como blanco una pastilla de sulfato de bario.

En cada imagen hiperespectral de hoja se seleccionaron $n = 32000$ espectros evitando el nervio principal, y se computó el espectro medio. Se constituyó un set de calibración formado por los 40 espectros medios de las 40 hojas. Dicho set fue sometido a dos pretratamientos sucesivos: Savitsky-Golay (suavizado mediante un ajuste a polinomio de grado 3, con una amplitud de ventana de 21 longitudes de onda y cómputo de la segunda derivada) y normalización Standard Normal Variate (SNV), para corregir los efectos aditivo y multiplicativo, respectivamente. Sobre este set de espectros pretratados se computó un Análisis de Componentes Principales (PCA). Las imágenes hiperespectrales

de las hojas se proyectaron sobre uno de los componentes principales obtenidos, el que se mostró más sensible al tratamiento de salinidad, consiguiendo las correspondientes imágenes artificiales de las proyecciones *scores*.

Posteriormente se computaron los histogramas relativos de las imágenes de *scores* de las hojas y sus correspondientes modas. Por último se realizó una clasificación no supervisada de los histogramas según el método de Ward (Ward, 1963).

Resultados y Discusión

Con los espectros medios de cada hoja se computó el espectro medio correspondiente a las 10 hojas de cada uno de los 4 niveles de salinidad. La Figura 1 muestra dichos espectros medios para las hojas del grupo control (Ct) y del grupo de mayor salinidad (S3). Las principales diferencias se pueden observar en el pico situado sobre 550 nm, en el valle a 680 nm y en la zona del infrarrojo.

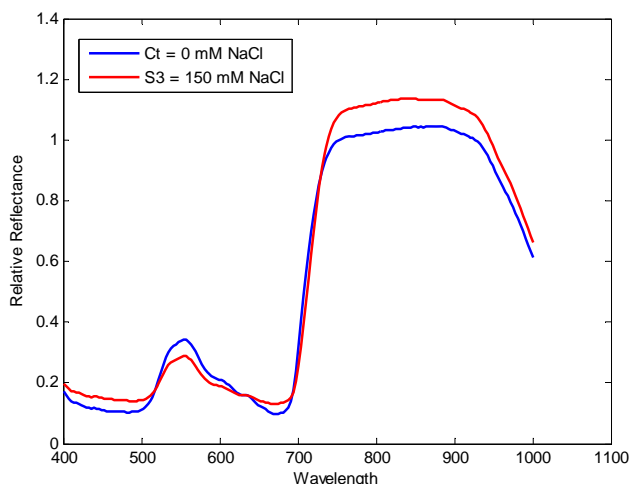


Figura 1.- Espectros medios de reflectancia relativa de las hojas del tratamiento control (Ct), en azul, y del tratamiento de mayor salinidad (S3), en rojo.

A 550 nm se observa una disminución en la altura del pico a mayor salinidad de las hojas. Este pico se encuentra en la zona del espectro visible correspondiente al color verde. Parece, por tanto, que cuanto mayor es la salinidad, menor reflectancia del color verde se produce en las hojas. En torno a 680 nm (banda de absorción de la clorofila) se observa un incremento en el nivel de reflectancia al aumentar la concentración de salinidad, que puede deberse a un menor contenido de clorofila. Por último, se produce un aumento de la reflectancia en el infrarrojo en el tratamiento de mayor salinidad respecto del tratamiento control (efecto similar al que se produce en hojas bajo estrés hídrico). La lechuga, cultivada en condiciones crecientes de salinidad, presenta una disminución progresiva del peso fresco así como de su contenido en agua (Eraslan, 2007). Numerosos artículos muestran que a medida que disminuye el contenido en agua de la vegetación aumenta la reflectancia en el infrarrojo (Tucker, 1980; Clevers et al., 2010). Todo ello está en consonancia con nuestros resultados.

Después del pretatamiento y de aplicar el PCA a los espectros del set de calibración se seleccionó el primer componente PC1 por presentar la mayor relación con la salinidad.

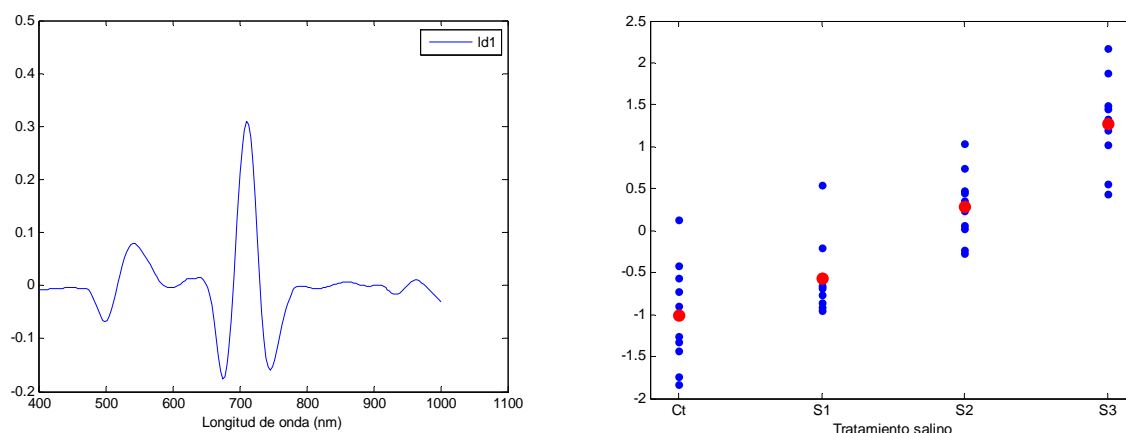


Figura 2.- Izqda: Componente Principal PC1 del PCA sobre los espectros corregidos con Savitsky-Golay y SNV. Dcha: Representación de los scores del PC1 para cada hoja (n=40) de cada tratamiento de salinidad. En rojo se muestra el valor medio de las hojas de cada tratamiento salino.

Los *loadings* del PC1 (Figura 2, izquierda) presentan dos zonas de interés: una relacionada con el nivel de reflectancia en el verde (alrededor de 550 nm), y otra relacionada con el *red edge* (en torno a 680-720 nm) aproximadamente lo que corrobora que se producen cambios en la absorción de la clorofila. Los correspondientes scores crecen con el nivel de salinidad (Figura 2, derecha). La Figura 3 muestra las imágenes de scores obtenidas al proyectar las imágenes hiperespectrales de las hojas, corregidas con Savitsky-Golay y SNV, sobre el PC1. Se aprecian claramente las diferencias entre las hojas Ct y las hojas S3, evolucionando desde píxeles azulados hacia naranjas y rojizos según aumenta la concentración de salinidad.

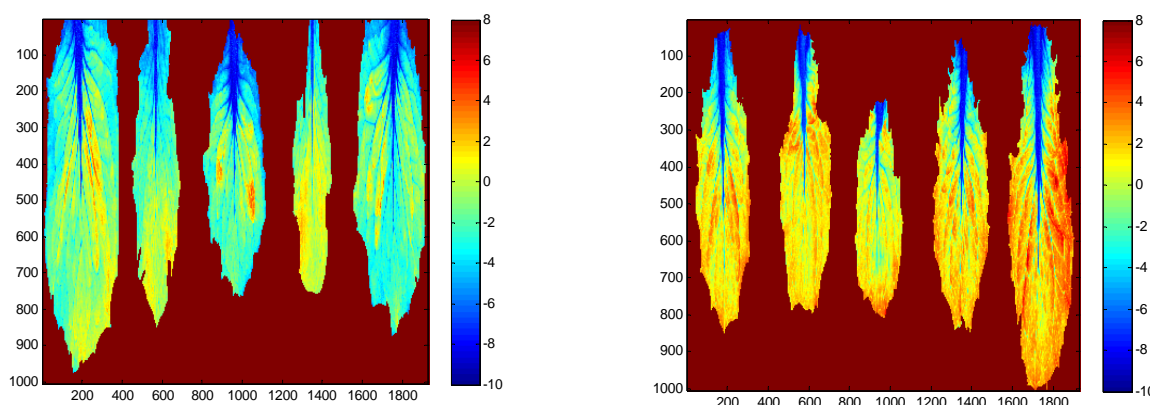


Figura 3.- Imágenes de scores tras proyectar las imágenes hiperespectrales, corregidas con Savitsky-Golay y SNV, sobre el PC1. Izqda: 5 hojas de tratamiento control. Dcha: 5 hojas de tratamiento S3.

En la Figura 4, izquierda, se presentan los histogramas medios de cada hoja y nivel de salinidad. Se comprueba cómo, según aumenta la concentración salina en la hoja, los histogramas se van desplazando hacia la derecha y se hacen, en general, más estilizados al concentrarse una mayor cantidad de píxeles en valores similares. Por otra parte la Figura 4 derecha muestra los rangos de los scores (media +/- rango intercuartil, caja azul, y rango total de los datos, líneas negras). Se pueden diferenciar bien los niveles de salinidad S2 y S3 entre ellos y respecto al Ct y al nivel S1.

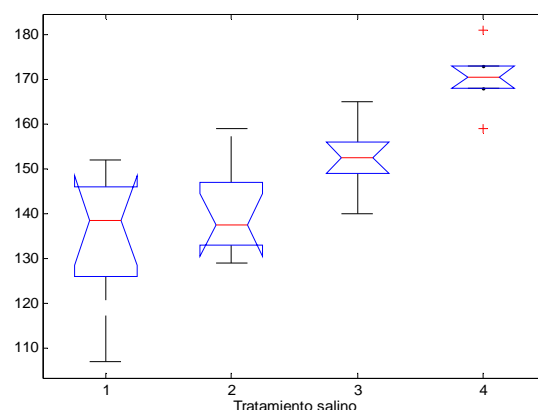
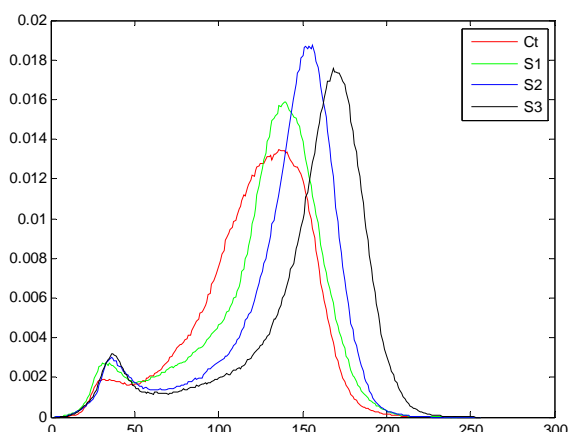


Figura 4.- Izqda: histogramas medios de las hojas correspondientes a cada tratamiento salino. Dcha: distribución de los valores de la moda de las hojas de cada tratamiento salino y comparación de los valores medios y varianza entre cada tratamiento.

Por último, se realizó una clasificación no supervisada de los histogramas de las hojas, según el método de Ward, obteniéndose el dendrograma correspondiente. Considerando tres clústeres (Figura 5) y las hojas que se agrupan en cada clúster (Tabla 1) se ve que el clúster 1 representa mayormente a las hojas de los tratamientos Ct y S1, el clúster 2 a las hojas del tratamiento S2, y el clúster 3 a las del tratamiento S3.

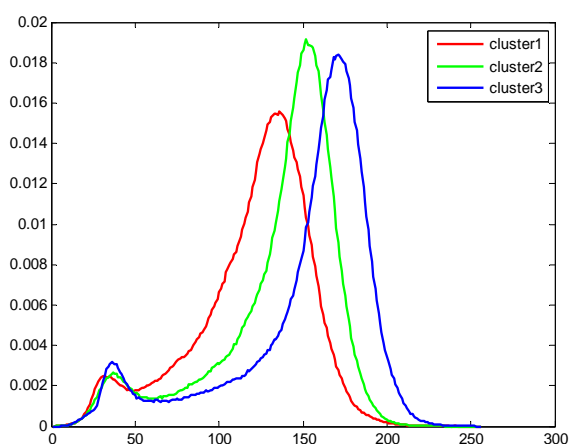


Tabla 1.- Número de hojas de cada tratamiento salino incluido en cada clúster considerado en la clasificación no supervisada según el método Ward.

	Tto. Ct	Tto. S1	Tto. S2	Tto. S3
Clúster 1	8	7	1	
Clúster 2	2	3	8	2
Clúster 3			1	8

Figura 5.- Histogramas medios correspondientes a cada clúster según la clasificación no supervisada de Ward.

Conclusiones

Se presenta una metodología para la evaluación de diferentes concentraciones de salinidad en hojas de lechuga baby mediante el empleo de imágenes hiperespectrales. Al computar un Análisis de Componentes Principales sobre los espectros medios de las hojas, suavizados y aplicada la segunda derivada con el algoritmo Savitsky-Golay y normalizados con SNV, se obtuvo que el primer componente era el que presentaba mayor relación con los cambios de concentración salina en las hojas. Al proyectar las imágenes hiperespectrales corregidas sobre el PC1 se obtienen las correspondientes imágenes virtuales de *scores* donde se pueden apreciar claras diferencias entre las hojas correspondientes a cada tratamiento salino.

Al comparar los espectros medios de reflectancia de las hojas de diferente salinidad se aprecian diferencias principalmente en la zona alrededor de 550 nm (zona de reflectancia del verde), de 680 nm (pico de absorción de la clorofila) y en la zona del infrarrojo NIR, lo cual está en concordancia con parte de la bibliografía.

Comparando los histogramas medios de cada tratamiento de salinidad se observan diferencias claras entre cada uno de ellos que permiten separarlos. Al analizar los valores de moda de los valores de *scores* de cada hoja se observan también diferencias entre los cuatro niveles de salinidad, observándose una cierta similitud entre los valores de los tratamientos Ct y S1, pero una diferencia clara con los tratamientos S2 y S3.

Estas diferencias se vuelven a manifestar al realizar una clasificación no supervisada por el método de Ward, considerando 3 clases, en las que se aprecia como la primera clase agrupa a las hojas de los tratamientos salinos Ct y S1, principalmente, y las otras dos clases agrupan a las hojas de los tratamientos S2 y S3 respectivamente.

Agradecimientos

La financiación de este trabajo ha sido cubierta por el MICINN con los proyectos Multihort (AGL2008-05666-C02-01) y Babyleaf (AGL2010-20070). LPF-TAGRALIA es parte del Campus CEI Moncloa.

Bibliografía

- Ayers, A.D., Wadleigh, C.H., Bernstein, L., 1951. Salt tolerance of six varieties of lettuce. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* **57**, 237±242.
- Carassay, L.R., Bustos, D.A., Golberg, A.D. & Taleisnik, E. 2012, Tipburn in salt-affected lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants results from local oxidative stress, *Journal of Plant Physiology*, vol. 169, no. 3, pp. 285-293.
- Clevers, J.G.P.W., Kooistra, L. & Schaepman, M.E. 2010, Estimating canopy water content using hyperspectral remote sensing data, *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, vol. 12, no. 2, pp. 119-125.
- Chisari, M., Todaro, A., Barbagallo, R.N. & Spagna, G. 2010, Salinity effects on enzymatic browning and antioxidant capacity of fresh-cut baby Romaine lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Duende), *Food Chemistry*, vol. 119, no. 4, pp. 1502-1506.
- Eraslan, F., Inal, A., Savasturk, O. & Gunes, A. 2007, Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity, *Scientia Horticulturae*, vol. 114, no. 1, pp. 5-10.
- Hamzeh, S., Naseri, A.A., AlaviPanah, S.K., Mojaradi, B., Bartholomeus, H.M., Clevers, J.G.P.W. & Behzad, M. 2013, Estimating salinity stress in sugarcane fields with spaceborne hyperspectral vegetation indices, *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, vol. 21, no. 0, pp. 282-290.
- Maas, E.V., Hoffman, G.J., 1977. Crop salt tolerance ± current assessment. *J. Irrig. Drainage Div. ASCE* **103**(IR2), 115±134.
- Scuderi, D., Restuccia, C., Chisari, M., Barbagallo, R.N., Caggia, C. & Giuffrida, F. 2011, Salinity of nutrient solution influences the shelf-life of fresh-cut lettuce grown in floating system, *Postharvest Biology and Technology*, vol. 59, no. 2, pp. 132-137.
- Shannon, M.C., Grieve, C.M., Francois, L.E., (1994). Whole-plant response to salinity. In: Wilkinson, R.E. (Ed.), *Plant-Environment Interactions*. Marcel Dekker, New York, pp. 199±244.
- Tucker, C.J. 1980, Remote sensing of leaf water content in the near infrared, *Remote Sensing of Environment*, vol. 10, no. 1, pp. 23-32.
- Ward, J.H., Jr. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* **58**:236-244.